动 物 学 研 究 2007, Aug. 28 (4): 430 - 436 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

从线粒体 Cyt *b* 基因探讨红瘰疣螈物种地位的有效性

张明旺[1,2], 饶定齐[1,*], 余国华[1], 杨君兴[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 疣螈属的红瘰疣螈(*Tylototriton shanjing*)和棕黑疣螈(*T. verrucosus*)的物种界限一直不清楚。测定了来自中国西南地区 14 个地点的 *T. shanjing* 和 *T. verrucosus* 共 40 只标本的线粒体 DNA Cyt *b* 基因(753 bp)。结果表明:(1)用邻接法、最大简约法和贝叶斯法等 3 种系统发育分析法分别重建棕黑疣螈种组系统发育树的拓扑结构不支持 *T. shanjing* 是单系群;(2)*T. shanjing* 与 *T. verrucsus* 的 mtDNA Cyt *b* 序列差异平均值仅为 1.2%, 未达到种级水平。因此, 全部 *T. shanjing* 样品都属于同一个物种, 即 *T. verrucosus*, 不支持 *T. shanjing* 的物种地位, *T. shanjing* 为 *T. verrucosus* 的同物异名, 并建议恢复 *T. verrucosus* 的中文名红瘰疣螈。根据基于 40 个样品 Cyt *b* 基因序列的系统发育树和遗传变异以及地理分布, 这些红瘰疣螈(*T. verrucosus*)样品聚为 3 支, 即中国西南地区的红瘰疣螈可分为片马、滇中滇西和滇东南 3 个地理居群。

关键词: 红瘰疣螈; 有效性; 线粒体 DNA; 细胞色素 *b*; 分类地位
中图分类号: Q951.3; Q959.52; Q349 **文章标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2007)04-0430-07

The Validity of Red Knobby Newt (*Tylototriton shanjing*) Species Status Based on Mitochondrial Cyt *b* Gene

ZHANG Ming-wang[1,2], RAO Ding-qi[1,*], YU Guo-hua[1], YANG Jun-xing[1,*]
(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The delimitation between *Tylototriton shanjing* and *T. verrucosus* was not clear. Forty individuals of *T. verrucosus* and *T. shanjing* were collected from fourteen localities in Southwest China and 753 bp of partial mitochondrial Cyt *b* gene sequence were sequenced. Molecular phylogenetic trees of *T. verrucosus* group were reconstructed using neighbor-joining, maximum parsimony and Bayesian inference methods. Pairwise sequence comparisons to determine the amount of variation were performed using MEGA 3.0 software. According to the results of phylogeny analysis and Kimura 2-parameter distance, the species validities were evaluated. The results showed that: (1) the *T. shanjing* did not form a monophyletic group; (2) the genetic distance was low between *T. shanjing* and *T. verrucosus*, it was only 1.2% on average. Therefore, *T. shanjing* as a valid species is not supported and can be argued to be a synonym of *T. verrucosus*. According to our phylogenetic tree, the genetic divergences and geographic distribution, *T. verrucosus*' distribution in the Yunnan Province can be divided into three geographic groups, i.e. the Pianma group, the Middle and West Yunnan group and the Southeast Yunnan group.

Key words: Red knobby newt (*Tylototriton shanjing*); Validity; Mitochondrial DNA; Cyt *b* gene; Taxonomic status

红瘰疣螈属于有尾目(Caudata)蝾螈科(Salamandridae)疣螈属(*Tylototrition*)棕黑疣螈种组(*Tylototriton verrucosus* group)。其中棕黑疣螈种组包括 4 个种, 红瘰疣螈、棕黑疣螈、贵州疣螈和大凉疣螈(Fei et al, 2006)。Anderson (1871) 依据采于我国云南西部腾冲 Nantin 和陇川户撒的标本命名为 verrucosus, 并依之建立新属 *Tylototriton*(疣螈属), 称为 *Tylototriton verrucosus*(长期以来中文名称红瘰疣螈一直是指 *Tylototriton verrucosus*)。之后, Nussbaum et al (1995) 在分析云南的

* 收稿日期: 2007-03-28; 接受日期: 2007-06-14
基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-119)
* 通讯作者(Corresponding authors), E-mail: raodq@mail.kiz.ac.cn; yangjx@mail.kiz.ac.cn

标本中发现有两种颜色类型：一种背部完全为棕黑色，另一种背脊和体侧瘰粒均为橙色。他们将后一种命名为新种 *Tylototriton shanjing*。Zhao et al（2000）将体背棕黑而无红色瘰粒的 *Tylototriton verrucosus* 的中文名称改为棕黑疣螈，而将背脊和体侧瘰粒均为橙色的 *Tylototriton shanjing* 中文名改为红瘰疣螈。

棕黑疣螈（*Tylototriton verrucosus*）在中国仅分布于云南西部边境少数地区，但却广泛分布于印度、尼泊尔、缅甸、老挝；而红瘰疣螈（*Tylototriton shanjing*）仅见于云南中部、南部及西部地区。然而，红瘰疣螈的分类地位一直存有争议（Nussbaum et al，1995；Lu，2001）。Lu（2001）以线粒体 DNA 上 16*S* rRNA、Cyt *b* 和 ND4 三个基因的片段共约 1 300 bp 的序列数据构建了中国蝾螈科的系统发育树，其中包括分别采自于云南陇川的棕黑疣螈（*T. verrucosus*）和云南金平的红瘰疣螈（*T. shanjing*）各一个个体。结果，从分子系统发育研究结果来看，这两个物种总是最先聚在一起，说明彼此间亲缘关系很近，它们之间的碱基替换率仅为 2.1%；与它们关系最近的是贵州疣螈（*T. kweichowensis*），与它们之间的碱基替换率分别达到了 5.9%和 5.5%。因此 Lu（2001）认为分子系统学结果不支持红瘰疣螈（*T. shanjing*）的种级地位。但是，使用很少量的个体来探讨分子系统学的问题，这种分析所得到的样品间的遗传差异到底是种间差异还是种内差异，是很难说清楚的（Zhou et al，2003）。另外，棕黑疣螈和红瘰疣螈的形态差异除了主要表现在色彩和瘰粒差异，此外并没有其它质的特征可以区分它们（Lu，2001）。因此，色彩和瘰粒差异是否为鉴定种的标准还存在疑问。目前，*T. shanjing* 和 *T. verrucosus* 的种间鉴别特征不明显，对 *T. shanjing* 的物种有效性仍存疑问，难以定论，给分类鉴定带来诸多困惑。究其原因为研究方法的局限性和研究标本的不足；由此看来对红瘰疣螈（*T. shanjing*）物种地位的有效性有必要进一步研究。

动物线粒体 DNA 呈母系遗传，因其分子量小、进化速度快（Brown，1981）等特性而被广泛地用于系统发育研究。在研究种间和种内进化关系和遗传多样性来说，快速进化的线粒体 DNA 已成为一个常用且有效的分子标记；线粒体 DNA 上的细胞色素 *b*（cytochrome *b*，Cyt *b*）基因的进化速度适中，一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至到科间的进化遗传信息（Kocher et al，1989），因此，Cyt *b* 成为研究种内或近缘种间系统发育和遗传问题最常用的工具之一，它的部分或全序列被广泛应用于动物类群的系统进化和分类研究中（Cao et al，2002；Irwin et al，1991；Wang et al，1999；Zhou et al，2001；Helm-Bychowski et al，1993）。本文测定了采自中国西南 14 个地区 39 只红瘰疣螈（*T. shanjing*）和 1 只采自于云南陇川的棕黑疣螈（*T. verrucosus*）的线粒体 DNA 的部分 Cyt *b* 序列，从分子水平探讨我国西南地区红瘰疣螈（*T. shanjing*）的分类地位及其与棕黑疣螈（*T. verrucosus*）的系统进化关系，以确定我国红瘰疣螈（*T. shanjing*）的分类地位。同时，本文为进一步探讨我国疣螈类种群的遗传变异及我国疣螈属的系统进化等问题，提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　样品的采集和 DNA 提取

本研究共采集到 43 个样品，其中 39 只红瘰疣螈（*T. shanjing*）、1 只棕黑疣螈（*T. verrucosus*）、2 只贵州疣螈（*T. kweichowensis*）、1 只大凉疣螈（*T. daliangensis*）的样品。39 只红瘰疣螈（*T. shanjing*）代表了在云南分布的大部分地区，详细信息见表 1 和图 1。收集的样品为个体的肝脏部位，并保存于浓度为 99%的酒精分析纯溶液中，－20℃冰箱保存。肝脏样品总 DNA 提取采用标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提的方法（Sambrook et al，1989）。

1.2　DNA 扩增、序列测定和分析

用于扩增 mtDNA Cyt *b* 基因的引物为 MVZ15（5′ GAACTAATGGCCCACACWWTACGNAA 3′）（Moritz et al，1992）和 MVZ16（5′ AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT 3′）（Chan et al，2001），总共测定了 43 个样品的 Cyt *b* 基因序列。所有 PCR 扩增都是在 ABI 9700 型扩增仪上完成。反应总体积为 50 μL。扩增反应条件：94℃预变性 5 min，然后运用如下条件进行 35 个循环：95℃变性 25 s，46℃退火 30 s，72℃延伸 60 s；最后在 72℃延伸 5 min。PCR 产物经过纯化后在 ABI 3730 自动分析仪上直接进行双向测序反应，以确保序列的准确性。

采用 DNASTAR6.0 软件包拼接双向测得的序列；序列比对利用 CLUSTAL W（1.81）（Thompson et al，1997）。我们手工修改那些显而易见的排序错误。用 DnaSP4.00（Rozas et al，2003）进行单倍型分析，采用 MEGA 3.0（Kumar et al，2004）中的

Kimura 双参数法计算遗传距离。

用 Mega 3.0（Kumar et al，2004），基于 Kimura 双参数法计算遗传距离模型，用 NJ 法构建系统进化树；用 PAUP* 4.0b10（Swofford，2002），采用最大简约法构建 Maximum parsimony（MP）树；对 NJ 树和 MP 树分别进行了自引导检验（bootstrap）获得系统分支的置信度（重复次数为 1 000）。根据 Modeltest 3.7（Posada & Crandall，1998）估算出数据最优模型。在 Modeltest 3.7 中产生最佳核苷酸模型为 HKY + G。用 MrBayes3.1.2（Ronquist & Huelsenbeck，2003）构建 Bayes 树，替换模型参数设置为核苷酸替换类型数 = 2（nst = 2）；设置位点间速率变异呈 gamma 分布（rates = gamma）。对 MCMC 变量运行 4 条马尔可夫链（Markov chains），以随机树为起始树，共运行 1 千万代，每 100 代进行一次抽样。大概采样 25 000 次（25%）后，采样值趋于稳定，所以在计算最后后验概率（posterior probabilities）时，会忽略最开始 25% 的采样量，根据剩余样本构建一致树，将所得结果进行统计，获得系统树的支系结构以及各支系的后验概率。系统发育树（NJ，MP 和 Bayes）均以大凉疣螈（*T. taliangensis*）和贵州疣螈（*T. kweichowensis*）作为外群来构建。

2 结 果

2.1 红瘰疣螈 Cyt *b* 基因序列及变异

所有 43 个样品 Cyt *b* 基因，除去两端不准确的部分，得到有效序列长度为 753 bp。将本实验测得的 39 个红瘰疣螈（*T. shanjing*）个体 Cyt *b* 基因的序列与 1 个棕黑疣螈（*T. verrucosus*）、2 个贵州疣螈、1 个大凉疣螈序列相比，共检测到 128 个可变位点，约占核苷酸总数的 16.99%，其中 70.3% 变异发生在密码子的第三位点，没有发现任何碱基的缺失或插入。

所有 43 个 mtDNA Cyt *b* 基因序列定义了 24 个单倍型，其中 1 个棕黑疣螈（*T. verrucosus*）和 39 个红瘰疣螈（*T. shanjing*）样品定义了 21 个单倍型（A—U）（表 1）。在 24 个单倍型中，红瘰疣螈和棕黑疣螈（单倍型 L）个体不具有共享单倍型，但是单倍型 U 为龙陵、永德、大姚、双柏、景东和六库（地点不祥）所共享，单倍型 C 为片马两个地点所共享，其余则为各地方种群所特有（表 1）。同时用 MEGA 3.0 中的 Kimura 双参数法计算这 24 个单倍型的遗传距离（表 2）。所有个体与外群的遗传变异范围处于 6.2%—10.6%，个体间平均遗传距离为 1.4%，与两外类群 *T. kweichowensis* 和 *T. taliangensis* 的平均遗传距离分别为 7.0% 和 9.8%；所有红瘰疣螈与外类群的遗传距离范围处于之间 6.9%—9.8%，个体间平均变异率为 1.4%。棕黑疣螈与所有红瘰疣螈个体间的平均遗传距离为 1.2%（0.4%—2.6%），而两外群间遗传距离为 9.5%—9.7%，可见红瘰疣螈和棕黑疣螈个体间的平均遗传距离（1.2%）远小于同种组内不同物种间的种间差距。

2.2 系统发育关系

用邻接法（neighbor-joining，NJ）、最大简约法（MP）和贝叶斯法分别对所有 24 个单倍型做分子系统发育分析，贵州疣螈和大凉疣螈作为外群。三种分析得到的系统发育树的拓扑结构大致相似（图 2，3）。从分子系统树中可以看出（图 2，3），中国红瘰疣螈（*T. shanjing*）没有构成一个单系，而是和棕黑疣螈（*T. verrucosus*）共同构成一个单系群，并有很高的支持率（BPP = 1.00，PP = 100，PP = 100），

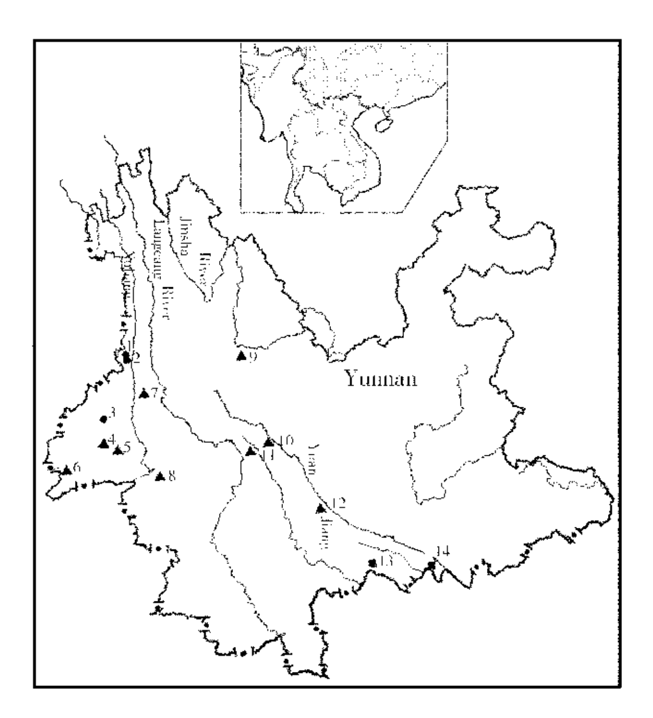


图 1 本研究种群采样点分布示意图

Fig. 1 Distribution range and sampling sites of *Tylototriton verrucosus* in China

片马地理居群、滇东南居群和滇中滇西居群分别用黑色圆点、正方形和三角形表示。数字代表各采样点的位置，详细情况参见表 1。

The Pianma mtDNA group is indicated with circles, the Southeast Yunnan group is indicated with square and the Middle and West Yunnan one with triangles. Figures indicate the sampling sites; refer to Table 1 for details.

表 1　标本及采集地（A-Y 代表不同单倍型）及对应 Cyt *b* 序列的 GenBank 序列号

Tab. 1　Species and their localities in the present study（A-Y indicate different haplotype）and GenBank accession number for Cyt *b* sequences of each sample

物种名 Species name	标本编号 Specimen number	采集地 Collection location	单倍型 Haplotype	GenBank 序列号 GenBank accession number
Tylototriton shanjing	JP-218	云南，金平（14）	E	EF627460
	JP-219	云南，金平（14）	E	EF627460
	JP-220	云南，金平（14）	D	EF627459
	LC-228	云南，绿春（13）	F	EF627461
	LC-229	云南，绿春（13）	B	EF627457
	LC-231	云南，绿春（13）	B	EF627457
	JD-113	云南，景东（11）	J	EF627465
	JD-114	云南，景东（11）	U	EF627476
	JD-115	云南，景东（11）	U	EF627476
	YJ-351	云南，元江（12）	I	EF627464
	SB-235	云南，双柏（10）	U	EF627476
	SB-236	云南，双柏（10）	U	EF627476
	DY-204	云南，大姚（9）	M	EF627468
	DY-205	云南，大姚（9）	U	EF627476
	DY-206	云南，大姚（9）	U	EF627476
	YD-7	云南，永德（8）	K	EF627466
	YD-8	云南，永德（8）	Q	EF627472
	YD-111	云南，永德（8）	K	EF627466
	YD-112	云南，永德（8）	U	EF627476
	LK-143	云南，地点不详（7）	S	EF627474
	LK-144	云南，地点不详（7）	U	EF627476
	LLMC-256	云南，龙陵，木城（5）	A	EF627454
	LLMC-257	云南，龙陵，木城（5）	H	EF627463
	LL-264	云南，龙陵，一碗水（4）	T	EF627475
	LL-265	云南，龙陵，一碗水（4）	U	EF627476
	LL-266	云南，龙陵，一碗水（4）	U	EF627476
	LL-267	云南，龙陵，一碗水（4）	R	EF627473
	LL-268	云南，龙陵，一碗水（4）	U	EF627476
	LL-269	云南，龙陵，一碗水（4）	O	EF627470
	LL-270	云南，龙陵，一碗水（4）	R	EF627473
	LL-271	云南，龙陵，一碗水（4）	R	EF627473
	LL-272	云南，龙陵，一碗水（4）	P	EF627471
	LL-273	云南，龙陵，一碗水（4）	T	EF627475
	LL-274	云南，龙陵，一碗水（4）	N	EF627469
	LL-275	云南，龙陵，一碗水（4）	O	EF627470
	TC-321	云南，腾冲（3）	G	EF627462
	PM-259	云南，片马，岗房（1）	C	EF627458
	PM-260	云南，片马，岗房（1）	C	EF627458
	PM-262	云南，片马（2）	C	EF627458
T. verrucosus	HS-356	云南，陇川，户撒（6）	L	EF627467
T. kweichowensis 1	ZD-192	云南，昭通	V	EF627453
T. kweichowensis 2	ZD-195	云南，昭通	W	EF627456
T. daliangensis	SCXC-350	四川，西昌	X	EF627455

括号内为种群代号；"U" 和 "C" 代表种群间共享单倍型；"7" 为购于六库，但标本采集地点不详；详见图 1。

Population codes given in the brackets; "U" 和 "C" indicate shared haplotype between different populations; "7" indicate the locality of Liuku, Yunnan, where the specimen was bought, but the collection locality is unknown; refer to Fig. 1. for details.

并且和外群贵州疣螈和大凉疣螈能完全分开。基于 Bayes 系统分支图（图 2），21 个单倍型聚合成 3 个分支，其中，Cladel 滇东南居群（Southeast Yunnan group）分支全部由金平和绿春个体组成；Clade2 片马居群（Pianma group）包括了腾冲和片马全部个体；Clade3 滇中滇西居群（Middle and West Yunnan group）包括元江、景东、双柏、大姚、永德、龙陵、陇川和六库（地点不详）全部个体。在 MP 树中（图 3），由红瘰疣螈和棕黑疣螈构成的单系内部也大致分为 3 个分支，但是 3 个分支之间的关系为多歧状态。另外，三个分支中 Clade1 滇东南居群和 Clade2 片马居群在三种构树方法中均得到了很高的支持（图 2，3），然而，Clade3 滇中滇西居群没有得到很好的支持，并且三个分支之间的关系

表 2 棕黑疣螈种组 Cyt *b* 基因片段序列 Kimura 2-parameter 距离

Tab. 2 Kimura 2-parameter distance among mitochondrial Cyt *b* gene for species of *Tylototriton verrucosus* group

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	L	V	W	X
A																								
B	0.023																							
C	0.023	0.030																						
D	0.022	0.007	0.029																					
E	0.020	0.003	0.027	0.004																				
F	0.020	0.003	0.027	0.004	0.003																			
G	0.019	0.027	0.009	0.026	0.024	0.024																		
H	0.001	0.024	0.024	0.023	0.022	0.022	0.020																	
I	0.013	0.026	0.024	0.024	0.023	0.023	0.022	0.015																
J	0.013	0.027	0.024	0.026	0.024	0.024	0.020	0.015	0.011															
K	0.009	0.027	0.024	0.026	0.024	0.024	0.020	0.011	0.011	0.011														
M	0.011	0.026	0.023	0.024	0.023	0.023	0.019	0.012	0.011	0.011	0.009													
N	0.009	0.024	0.022	0.023	0.022	0.022	0.018	0.011	0.009	0.009	0.008	0.007												
O	0.009	0.023	0.019	0.022	0.020	0.020	0.015	0.011	0.009	0.009	0.008	0.007	0.003											
P	0.008	0.023	0.020	0.022	0.020	0.020	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.005	0.004	0.004										
Q	0.008	0.023	0.020	0.022	0.020	0.020	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.005	0.004	0.004	0.003									
R	0.008	0.023	0.020	0.022	0.020	0.020	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003								
S	0.008	0.023	0.020	0.022	0.020	0.020	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003							
T	0.008	0.023	0.020	0.022	0.020	0.020	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.005	0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.003						
U	0.007	0.022	0.019	0.020	0.019	0.019	0.015	0.008	0.007	0.007	0.005	0.004	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001					
L	0.011	0.026	0.023	0.024	0.023	0.023	0.019	0.012	0.011	0.011	0.009	0.008	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.004				
V	0.071	0.079	0.078	0.077	0.076	0.076	0.074	0.072	0.068	0.069	0.069	0.065	0.063	0.063	0.065	0.065	0.065	0.062	0.062	0.063	0.065			
W	0.072	0.080	0.080	0.079	0.077	0.077	0.075	0.074	0.069	0.071	0.071	0.066	0.065	0.065	0.066	0.066	0.066	0.063	0.063	0.065	0.066	0.001		
X	0.093	0.105	0.106	0.101	0.102	0.102	0.100	0.100	0.101	0.100	0.100	0.093	0.093	0.093	0.095	0.095	0.095	0.092	0.092	0.094	0.095	0.095	0.097	

字母代表单倍型，详细情况参见表 1。黑体数字代表了 *T. verrucosus/shanjing* 单倍型之间的遗传距离。

Capital letters indicate the haplotypes, the abbreviation is detailed in Tab 1. The boldface numbers are values of genetic distance among the *T. verrucosus/shanjing*.

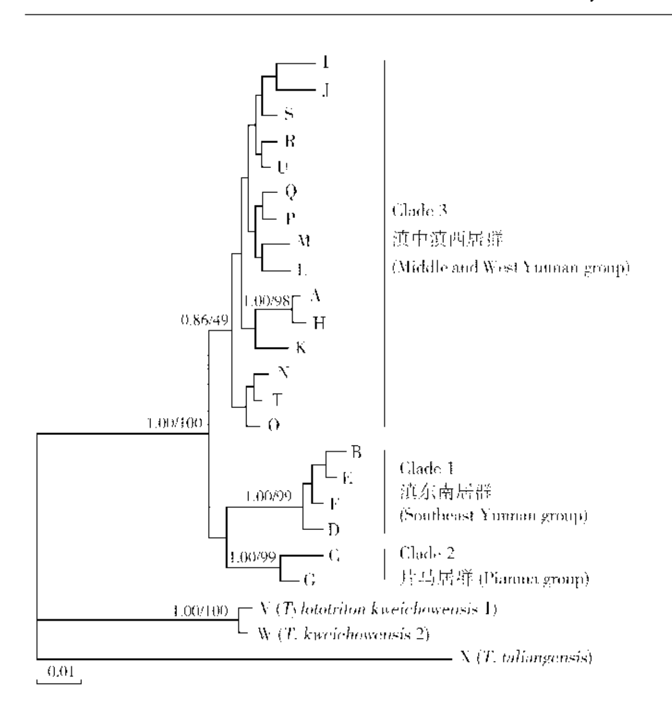


图 2　基于贝叶斯分析方法基础上的线粒体 Cyt *b* 基因部分序列单倍型构建的 Bayes 树

Fig. 2　Bayes tree for the haplotypes of mtDNA Cyt *b* gene in the present study

枝上的数字分别为后验率和 NJ 法的支持率；字母代表单倍型，详细情况参见表 1。

The values on the branch indicated the BPP and bootstrap support for NJ; capital letters indicate the haplotypes, the abbreviation is detailed in Table 1.

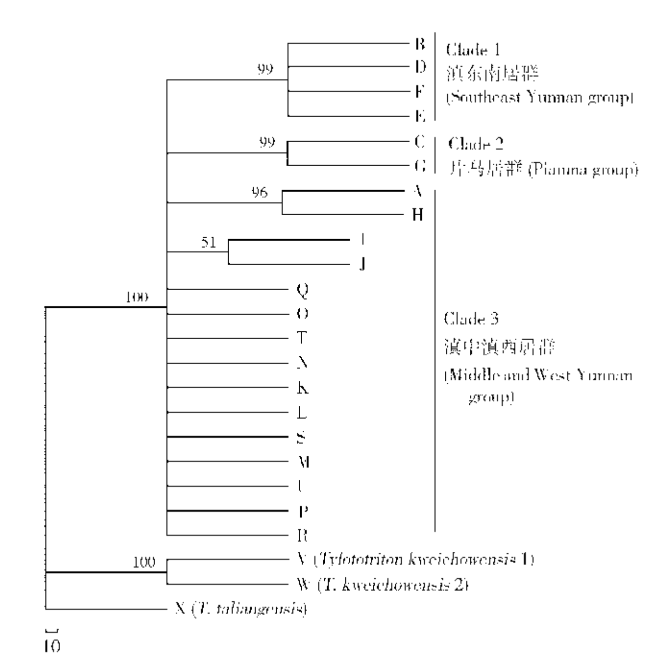


图 3　基于最大简约分析方法（MP）基础上的线粒体 Cyt *b* 基因部分序列单倍型构建的最大简约树

Fig. 3　MP tree for the haplotypes of mtDNA Cyt *b* gene in the present study

枝上的数字为支持率；字母代表单倍型，详细情况参见表 1。

The values on the branch indicated that the bootstrap support for MP; capital letters indicate the haplotypes, the abbreviation is detailed in Table 1.

并没有解决。用 MEGA 3.0 软件计算三个 Clade 之间的平均遗传距离为 Clade1/Clade2 = 2.7%，Clade1/Clade3 = 2.3% 和 Clade2/Clade3 = 2.0%；同时各分支内标本间的遗传变异率均未超过 1%。

3　讨　论

线粒体 cyt *b* 成为研究种内或近缘种间系统发育和遗传问题最常用的工具之一，并且它的序列的差异被广泛应用于动物类群的分类研究中（Bradley & Baker，2001；Li et al，2006）。近年来动物 cyt *b* 基因研究表明，种内个体间序列差异一般在 0%—4.06%之间，超过 6%的个体间已有明显的亚种或种的分化（Yang et al，2001；Yang et al，2002；Wang et al，2004）。而在蝾螈科动物中，种间线粒体 DNA 的序列差异一般约在 8.1%—15.8%之间，而种内差异在 3.5%以下（Chan et al，2001）。本文通过与外类群 *T. taliangensis* 和 *T. kweichowensis* 的遗传变异率的分析比较，可以看出，棕黑疣螈和红瘰疣螈之间的遗传变异率（0.4—2.6%）远小于两外类群间的变异率（9.5%—9.7%），也远小于这两者分别与外类群间的变异率（6.2%—10.6%）。因此，从 mtDNA Cyt *b* 序列差异，支持红瘰疣螈与棕黑疣螈间的 DNA 差异值（0.4%—2.6%）处在种内差异范围内。从而，在分子水平上证实了红瘰疣螈（*T. shanjing*）和棕黑疣螈（*T. verrucosus*）之间具有种内差异，红瘰疣螈与棕黑疣螈的遗传分化未达到种级水平。分子系统发育分析进一步表明，不支持红瘰疣螈（*T. shanjing*）的单系性，且两者之间的亲缘关系明显地较它们与外类群的亲缘关系更近，两者处于种内水平。本文结果同 Lu（2001）研究结果一致。另外，棕黑疣螈（*T. verrucosus*）和红瘰疣螈（*T. shanjing*）的形态差异主要表现在色彩和瘰粒差异（棕黑疣螈瘰粒小，彼此区分不十分清晰；而红瘰疣螈瘰粒圆且大，彼此区分十分明显）(Lu，2001)，此外并没有其它质的特征可以区分它们。综上所述，结合形态和分子系统分析的结果支持 *T. verrucosus* 和 *T. shanjing* 为同一物种。因 *T. verrucosus*（1871）的定名早于 *T. shanjing*（1995），遵照国际命名法规，后者应归入前者，即 *T. shanjing* 为 *T. verrucosus* 的同物异名。另外，又由于

T. verrucosus 的中文名红瘰疣螈早于棕黑疣螈，所以，我们建议恢复 *T. verrucosus* 的中文名红瘰疣螈。

此外，从本文的初步研究结果看，分布于中国的红瘰疣螈（*T. verrucosus*）大致可划分为 3 个地理居群（图 3），即滇东南居群、片马居群和滇中滇西居群。关于红瘰疣螈的种群的遗传多样性和系统地理学研究，有待于今后进一步加大样本量、采集地点和基因片段来加以探讨。

致谢：本研究得到了中科院昆明动物所贯黎老师在实验中的热心帮助，范朋飞博士、孙国政博士在野外采集中给予了大力协助，在此谨致衷心的感谢。

参考文献：

Anderson J. 1871. Description of a new genus of newts from western Yunnan [J]. *Proc Zool Soc Lond*, 423-425.

Bradley RD, Baker RJ. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome-*b* sequence and mammals [J]. *Journal of Mammalogy*, **82** (4): 960-973.

Brown WM. 1981. Mechanism of evolution in animal mitochondrial DNA [J]. *Annals of the New York Academy of Science*, **361**: 119-134.

Cao LR, Wang XM and Fang SG. 2003. A molecular phylogeny of bharal and dwarf blue sheep based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **49** (2): 198-204. [曹丽荣，王小明，方盛国. 2003. 从细胞色素 b 基因全序列差异分析岩羊和矮岩羊的系统进化关系. 动物学报，**49** (2): 198-204.]

Chan LM, Zamudio KR, Wake DB. 2001. Relationships of the salamandrid genera *Paramesotriton*, *Pachytriton* and *Cynops* based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Copeia*, 997-1009.

Fei L, Hu SQ, Ye CY, Huang YZ. 2006. Fauna Sinica, Amphibia Vol.1. General accounts of Amphibia Gymnophiona and Urodela [M]. Science Press, Beijing, China. [费 梁，胡淑琴，叶昌媛，黄永昭等. 2006. 中国动物志，两栖纲（上卷），总论 蚓螈目，有尾目，科学出版社，北京]

Helm-Bychowski K, Cracraft J. 1993. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvine assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-*b* gene [J]. *Mol Biol Evol*, **10**: 1196-1214.

Irwin DM, Kocher TD and Wilson AC. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals [J]. *J Mol Evol*, **32**: 128-144.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards A, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplication and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 6196-6200.

Kumar S, Tamura K and Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.

Li G, Jones G, Rossiter SJ, Chen SF, Parsons S, Zhang S. 2006. Phylogenetics of small horseshoe bats from east asia based on mitochondrial dna sequence variation [J]. *Journal of Mammalogy*, **87** (6): 1234-1240.

Lu SQ. 2001. Phylogeny of Chinese Salamanders (Caudata: Salamandridae) inferred from MtDNA sequences [D]. Ph. D. thesis, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences. [吕顺清. 2001. 我国蝾螈科动物的分子系统发育研究. 博士学位论文，中国科学院昆明动物研究所.]

Moritz C, Schneider CJ, and Wake DB. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation [J]. *Systematic Biology*, **41**: 273-291.

Nussbaum RA, Brodie Jr, ED, Yang DT. 1995. A taxonomic review of *Tylototriton verrucosus* Anderson (Amphibia: Caudata: Salamandridae) [J]. *Herpetologica*, **51**: 257-268.

Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, **19**: 2496-2497.

Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. [M]. Second Edition. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4. Sinaeur Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Mougin FJ, Higgins DG, 1997. The Clustal X Windows interface, Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, **25**: 4874-4882.

Wang YQ, Xu QS, Peng XX, Zhou HT. 2004. Taxonomic status of amphioxus Branchiostoma belcheri in Xiamen Beach estimated by homologous sequence of Cyt *b* gene [J]. *Acta Zool Sin*, **50** (2): 60-66. [王义权，许群山，彭宣宪，周涵韬. 2004. 通过 Cyt *b* 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. 动物学报，**50** (2): 60-66.]

Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, Yang G, Xu GJ. 1999. The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of Cyt *b* gene fragment [J]. *Acta Zool Sin*, **45** (3): 332-338. [王义权，周开亚，徐珞珊，杨 光，徐国均. 1999. 几种游蛇的 Cyt *b* 基因片段序列分析及其演化关系. 动物学报，**45** (3): 332-338.]

Yang XG, Wang YQ, Zhou KY, Liu ZQ. 2001. Phylogenetic relationships of Chinese Brown Frogs (*Rana*) based on sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene [J]. *Zool Research*, **22** (5): 345-350. [杨学干，王义权，周开亚，刘中权. 2001. 从细胞色素 *b* 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系. 动物学研究，**22** (5): 345-350.]

Yang XG, Wang YQ, Zhou KY, Liu ZQ. 2002. The authentication of *Oviductus* Ranae and their original animals by using molecular marker [J]. *Bio Pharm Bull*, **25** (8): 1035-1039.

Zhao EM, Zhang XW, Zhao H, Ying Y. 2000. Revised checklist of Chinese amphibian and amphibian [J]. *Sichuan J Zool*, **19** (3): 196-207. [赵尔宓，张学文，赵 蕙，鹰 岩. 2000. 中国两栖纲和爬行纲动物校正名录. 四川动物，**19** (3): 196-207.]

Zhou CQ, Zhou KY, Hu JC. 2003. The validity of the dwarf bharal (*Pseudois schaeferi*) species status inferred from mitochondrial Cyt *b* gene [J]. *Acta Zool Sin*, **49** (5): 578-584. [周材权，周开亚，胡锦矗. 2003. 从线粒体细胞色素 *b* 基因探讨矮岩羊物种地位的有效性. 动物学报，**49** (5): 578-584.]

Zhou JL, Zhang YP, Huang MH, Chen YJ, Chen XQ, Yao GD. 2001. Phylogenetic relationships among Crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations [J]. *Acta Zool Sin*, **47** (4): 361-366. [周继亮，张亚平，黄美华，陈永久，陈小青，姚耿东. 2001. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育. 动物学报，**47** (4): 361-366.]